

04. Sterilizasyon ¹

Prof. Dr. A. Kadir Halkman

Ankara Üniv. Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

04.01. Genel Bilgiler

04.02. Nemli Sıcak Uygulaması

04.02.01. Otoklavda Sterilizasyon

04.02.02. Kaynatarak–Isıtarak Sterilizasyon

04.02.03. Tindelizasyon

04.03. Kuru Sıcak Uygulaması

04.04. Membran Filtrasyon

04.05. Kimyasal Madde ile Sterilizasyon

04.06. Işınlama ile Sterilizasyon

04.07. Sterilizasyon Kontrolü

04.08. Sterilize Edilmeyen Çözeltiler

04.09. D ve Z Değerleri

04.01. Genel Bilgiler

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında elde edilen sonuçların güvenilir olması için belirli çalışma kurallarına eksiksiz uyulması gerekir. Bunların en önemlilerinden birisi de, kullanılan malzemenin steril olmasıdır.

Besiyerleri, besiyeri katkıları, çözeltiler, cam malzeme, blender gövdesi vb. malzeme steril olmazsa; bunlardan gelebilecek mikroorganizmalar, gıdadan gelmiş gibi değerlendirilir. Örneğin, analiz edilen gıdada *E. coli* yok, fakat bir önceki analizde kullanılan pipette *E. coli* kalmışsa, analiz sonunda "*E. coli* var." şeklinde sahte pozitif sonuç içeren bir rapor verilecektir.

Standart gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında, besiyerleri çok büyük çoğunlukla farklı normlarda olmak üzere otoklavda ya da basitçe kaynatarak, bazen de membran filtrasyonla, cam malzeme ise etüvde kuru sıcak uygulamasıyla sterilize edilir.

Sterilizasyon bir kavram olarak "belirli bir ortamı tüm mikroorganizmalarından arındırmak" olarak tanımlanır. Buna göre; mikroorganizmaları öldürmek şart değildir, membran filtrasyon sadece fiziksel bir ayırımdır.

Dezenfeksiyon ise, çok basit bir tanımlama ve çoğunlukla kimyasal madde kullanımı ile özdeş olmak üzere, "yüzeylerin her türlü hastalık yapıcı etkenlerden yani mikroorganizmalardan arındırılması (öldürmek veya güvenilir seviyelere indirmek) için uygulanan kimyasal işlemler" olarak nitelenmektedir.

Bununla birlikte; gıda mikrobiyolojisinde sadece hastalık yapıcı etmenler değil, saprofitler de ele alınır. Buna göre, analiz edilecek örnek ambalajının dış yüzünün alkol ya da amaca uygun başka bir kimyasal ile silinerek her türlü mikroorganizma varlığından arındırmak sterilizasyon olsa da, uygulama olarak dezenfeksiyondur.

¹ www.mikrobiyoloji.org ana sayfasında görülen Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları; "Anonymous, 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed: A. K. Halkman. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 358 sayfa." adlı kitabın 04. bölümüdür.

Benzer kavram karmaşaları pastörizasyon ve ticari sterilizasyonda da vardır.

Pastörizasyon, 100 °C altındaki ısı işlemi tanımlar. Buna göre, otoklav (basınç) kullanılmadan yapılan nemli sıcak uygulaması pastörizasyondur. İçme sütü ve meyve suyu için yaklaşık olarak aynı ısı işlem uygulanmakla birlikte; pastörize içme sütünün raf ömrü, soğukta depolamak kaydı ile sadece 1 hafta kadar iken, meyve suyu steril kabul edilir ve oda sıcaklığında aylarca depolanabilir. Bu 2 gıda arasındaki temel fark asitliktir. Bu kavram, aşağıda ayrıntılı olarak açıklanacaktır.

Bu aşamada ticari sterilizasyon tanımı üzerinde de durulmalıdır.

UHT sütün ya da bezelye konservesinin birim ambalajında yetersiz ısı işlem nedeni ile sadece bir tek canlı bakteri sporu bile bulunursa, hızla vejetatif hale geçer ve sonra çoğalarak ürünü bozar.

Oysa, meyve suyu ve konsantresi ile salça gibi asitli ürünlerde, yetersiz ısı işlem sonucunda canlı kalan bakteri sporları, ortamdaki yüksek asitlik nedeni ile kolaylıkla vejetatif hale geçip, çoğalamaz ya da bu işlem süt, sebze konservesi gibi nötral ürünlere oranla çok daha uzun sürede gerçekleşir. Buna karşın, standart mikrobiyolojik analizlerde besiyerine geçen bu sporlar, asitlik gibi olumsuz koşullardan kurtuldukları için hızla germeye olup, koloni oluşturur.

Buna göre, standart mikrobiyolojik analizlerde saptanan bu mikroorganizmaların üründe de gelişerek mutlaka bozulma yapacağı anlamı çıkarılmamalıdır.

Asidik ürünlere uygulanan ısı işlem, bu nedenle "ticari sterilizasyon" adını alır. Bir başka deyiş ile, bu gibi ürünler UHT içme sütünde olduğu gibi mutlak steril olmak zorunda değildir, ancak ticari anlamda steril kabul edilir. Bu ürünlerde canlı kalmış olan bakteri sporları genellikle sorun çıkarmaz. Uygulanan ısı işlem "gelişerek bozulma yapma potansiyeline sahip mikroorganizmaların tahribi için yeterlidir". Bu işlem sırasında patojenlerin tümü öldürülür.

Mikrobiyolojide kullanılan besiyerlerinin sterilizasyonunda da benzer ilkelerden yararlanılır. VRB Agar besiyeri sadece kaynatılarak "sterilize" edilir. Burada amaç sadece besiyeri, su, kullanılan cam malzeme, tartım kayıkçığı, spatül vb. materyalden gelebilecek Enterobacteriaceae familyası üyelerinin öldürülmesine yöneliktir. Sporsuz tüm bakteriler, sporlu ya da vejetatif haldeki maya ve küfler uygulanan bu ısı işlem ile ölür. Besiyerinde canlı olarak kalmış olan sporlu bakterilerin besiyeri bileşimindeki çeşitli inhibitörler nedeni ile vejetatif hale geçip, koliform bakterilere benzer ya da benzemez koloni oluşturma olasılığı standart analiz süresi olan 48 saat içinde mümkün değildir.

Tersine, Plate Count Agar, CASO Broth, yarı katı Nutrient Agar gibi genel besiyerlerinin mutlak steril olması gereklidir.

VRB Agar örneğinde, uygulanan ısı işlem normu Enterobacteriaceae familyası üyesi bakterilerin öldürülmesine değil, agarın eritilmesine göre ayarlanmıştır. Bu amaç için uygulanan ısı işlemde, Enterobacteriaceae familyası üyesi bakteriler zaten öldürülür. VRB Agar yanında, Rambach Agar vb. pek çok besiyerinde selektiviteye bağlı olarak, sadece agarın eritilmesi için uygulanan ısı işlem, bu besiyerinde standart inkübasyon süresi içinde olmak kaydı ile gelişebilecek tüm mikroorganizmaların tahribi için yeterlidir.

Salmonella analizinde kullanılan Selenite Cystine Broth hazırlanmasında uygulanan ısı işlem normu "sadece 60 °C'a kadar ısıtmak" şeklindedir ve bu norm doğrudan bu besiyerinde gelişebilecek olan Enterobacteriaceae familyası üyelerini öldürmek içindir.

Genel olarak mikrobiyolojide sterilizasyon denildiğinde, ısı işlem (nemli ve kuru sıcak), membran filtrasyon, kimyasal madde ile sterilizasyon ve ışınlama ile sterilizasyon yöntemleri anlaşılmaktadır. Bunlardan kimyasal madde uygulaması ve kuru hava sterilizasyonu, besiyerlerine ve çözeltilere uygun değildir. Işınlama ise pratik olarak uygulanacak bir yöntem değildir, sadece özel amaçlı dehidre besiyeri üretiminde kullanılır.

Aşağıda, besiyerleri ve çözeltilerin sterilizasyonunda en yoğun kullanılan nemli sıcak uygulaması hakkında ayrıntılı bilgi verilmiş, diğer sterilizasyon yöntemlerine kısaca değinilmiştir.

04.02. Nemli Sıcak Uygulaması

Nemli sıcak uygulamasının kuru sıcak uygulamasına göre daha etkili olduğu, mikrobiyolojinin ilk gelişme dönemi olan R. Koch zamanından beri bilinmektedir. Yüksek sıcaklıktaki ısı işlemin mikroorganizmaları öldürdüğü açıktır. Burada nemli ve kuru sıcak uygulaması arasındaki fark, sadece ısı enerjisinin iletilmesidir. Su buharı, ısı enerjisini kuru havaya göre çok daha iyi bir şekilde iletmediği için sterilizasyonda çok daha etkilidir. Buna göre sterilizasyon etkisi, nemli sıcak uygulamasında 121 °C'da 15 dakikada, kuru hava sterilizasyonunda ise ancak 170 °C'da 2 saat içinde sağlanmaktadır.

04.02.01. Otoklavda Sterilizasyon

Isıl işlem, özel olarak aksine bir uyarı yoksa, otoklavda ve 121 °C'da yapılır. Uygulama süresi çoğunlukla 15–20 dakika olarak verilir. Bazı kaynaklarda, ısı işlem normu sıcaklık ile değil, basınçla gösterilir. Aşağıda basit bir sıcaklık–basınç dönüşüm çizelgesi verilmiştir.

Çizelge 04. Sıcaklık–Basınç Dönüşümü

Sıcaklık		Basınç		Sıcaklık		Basınç	
°C	°F	kg/cm ²	psi*	°C	°F	kg/cm ²	psi*
100	212	0,00	0,0	121	250	1,02	15,0
105	221	0,19	2,8	125	257	1,29	19,0
110	230	0,41	6,0	130	266	1,67	24,5
115	239	0,67	9,8	134	273	2,00	29,4

* psi: pound per square inch; inç kareye pound (libre) olarak basınç.

Sterilizasyonun amacı, dehidre besiyeri, besiyeri katkıları, cam malzeme, tartım ekipmanı, su, pamuk vb. materyalden gelebilecek mikroorganizmaların tümünü öldürmektir. Böylece besiyerinde gelişen mikroorganizma, çalışma özelliğine göre örnekten/ana kültürden gelmiş olacaktır. Bu mantık altında besiyerinin sterilize edilmesi için elden geldiği ölçüde yüksek sıcaklık ve uzun süre uygulanması gerekir. Ancak, 50 °C üzerindeki sıcaklıklarda besin maddeleri ve agarın jelleşme özelliği olumsuz etkilenir. Bu olumsuzluk, çeşitli kontrol çalışmalarında sahte negatif sonuçların alınmasına yol açabilir.

Bu açıdan bakıldığında da elden geldiği ölçüde düşük sıcaklık ve kısa süre uygulaması bir anlamda zorunluluktur. Kuşkusuz, bu koşulda sterilizasyon sağlanamaz ve kontrol amaçlı çalışmalarda sahte pozitif sonuçlar alınır. Bu çerçevede, besiyerinin içinde bulunabilecek tüm mikroorganizmaları öldürmek, ancak besiyerine en az zarar verecek bir ısı işlem normunun seçilmesi gerekir. Bu norm, 121 °C'da 15–20 dakika olarak ortaya çıkar.

Isıl işlem normunu öncelikle sterilize edilecek besiyerinin hacmi, besiyerinde agar olup olmaması ve cam malzemenin cinsi etkiler.

Genel bir yaklaşım ile, 15 dakikalık ısı işlem süresi standart test tüplerinden, 250 mL hacme kadar geçerlidir. 500 mL hacim için 20 dakika, 1 litre hacim için 25 dakika süre kullanılmalıdır.

Prensip olarak, aksine ve özel olarak belirtilmemiş ise, 1 litre hacim otoklavda sterilizasyon için üst sınırdır. Günlük uygulama için önerilen şekil 500 mL erlende 250 mL besiyeridir.

Yapılan bir araştırmada aynı et kalınlığına sahip cam kaplar kullanılmış ve besiyeri sıcaklığının otoklavda 121 °C'a çıkma süresi 500 mL için 18 dakika, 1 litre için 22 dakika, 2 litre için 27 dakika ve 5 litre için 37 dakika olarak bulunmuştur. Bu durumda, 5 litrelik bir kapta sterilizasyon yapılırken otoklav sıcaklığı 121 °C'a çıktığında sadece 15 dakika beklenirse, besiyeri sıcaklığı soğuk noktada henüz 121 °C'a ulaşmamış olacaktır.

Bir diğer deyiş ile otoklav içi sıcaklık ile otoklavdaki besiyeri sıcaklığı aynı değildir ve otoklav sıcaklığı olarak ölçülen değer otoklavdaki atmosferin sıcaklığını göstermektedir.

Besiyeri bileşiminde agar varsa, ısı iletimi agarsız olanlara göre daha yavaş olacaktır. Agar ısıyı zayıf ileten bir bileşiktir. Dolayısı ile agarlı besiyeri, hacimle ilişkili olarak agarsız olanlara göre 2-5-10 dakika gibi daha uzun süre ile sterilize edilmelidir. Yapılan bir araştırmada, ince çeperli bir kapta 500 mL agarlı besiyerinin, aynı hacimde normal çeperli bir kaptaki saf suya göre 121 °C'a 6 dakika daha geç ulaştığı belirlenmiştir.

Besiyerinin sterilize edileceği cam kabın et kalınlığı ısı iletiminde önemli bir faktördür. Doğal olarak ince et kalınlığına sahip standart erlen ve balonlar ısıyı normal bir şekilde iletirken, kalın et duvarlı özel şişelerde ilave sterilizasyon sürelerine gerek duyulur.

Otoklavda sterilizasyonda dikkate alınması gereken en önemli ayrıntı, "toplam ısı girişi" kavramıdır. Bu kavram, 50 °C üzerindeki sıcaklık/süre alanıdır. Şekil 06'daki 4 farklı otoklavlama örneğinde toplam ısı girişi gösterilmiştir.

121 °C'da 15 dakika olarak verilen ısı işlem normu, normal olarak çalışan ve çabuk ısıtılıp çabuk soğuyan bir otoklav için verilen toplam ısı girişini belirtmektedir.

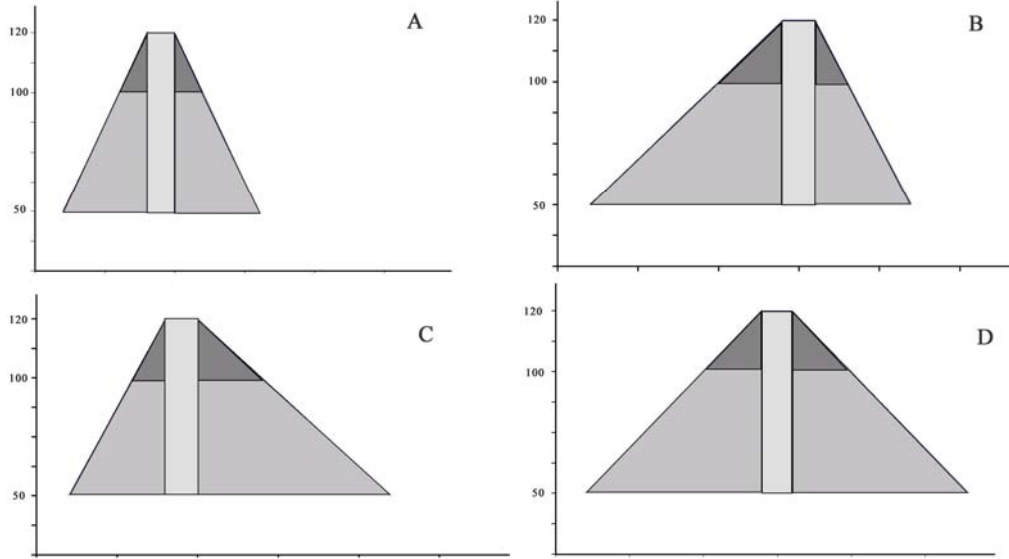
Şekilden görüldüğü gibi, 121 °C'da tutma süresi her 4 koşulda da 15 dakika olmakla birlikte, toplam ısı girişi olarak gösterilen taralı alanlar, standart "a" otoklavı dışındakilerde daha fazladır ve diğer 3 koşulda besiyeri gereğinden fazla olarak otoklavda tutulmuştur.

Doğru çalışan bir otoklav, hava çıkışı tamamlanıp, basınç uygulamaya başlanmasından 15 dakika (tercihen 5 dakika) içinde 120±1 °C'a erişmelidir. Sterilizasyon tamamlandıktan sonra buhar çıkışının çok az açılarak basıncın kademeli olarak azaltılması zorunludur.

Basınç çok hızlı olarak düşerse otoklav içindeki besiyeri ve çözeltiler kaynar ve kap dışına taşar. Agarlı besiyerinin otoklav içine dökülmesi ciddi arızalara neden olabilir. Bazı

modellerde soğutma otomatik olarak yapılır. İdeal olarak, otoklavda kalma süresi toplam 1 saattir.

Şekil 06. Toplam Isı Girişi.



Şekil (a) normal bir otoklavda, şekil (b) arızalı olduğu için geç ısınan bir otoklavda, şekil (c) -örneğin öğle saatine geldiği için- sterilizasyon sonrası kapalı bırakılan normal çalışan bir otoklavda ve şekil (d) ise hem arızalı olduğu için geç ısınan hem de sterilizasyon sonrası kapalı bırakılan bir otoklavda 50 °C üzerindeki toplam ısı girişini belirten alanları göstermektedir.

Burada 121 °C'a gelinceye kadar ve 15 dakika bekleme süresinden sonraki soğuma sürecindeki ısı girişi hesaba katılmamaktadır. Oysa, bunlar dikkate alındığında sterilizasyon etkisinin çok daha yüksek olacağı görülür. Örneğin, 118 °C'da 1 dakika ile 121 °C'da 0,35 dakika tutmanın öldürücü ısı işlem etkisi eşdeğerdir.

Besiyerlerinin sterilizasyonunda kullanılacak otoklavlar farklı şekillerde olabilir. En basit otoklavlar ev tipi düdüklü tencere benzeri olup, bunlara sıcaklık ve basınç göstergeleri eklenmiştir. Standart otoklavlar yatık ve dik tiplerde olabilir.

Otoklavda sterilizasyonun esası, havanın su buharı ile yer değiştirmesi ve böylece buhar aracılığı ile ısı aktarımının daha kolay yapılmasıdır. Buna göre, otoklavda önce havanın tam olarak çıkması sağlanmalı, sonra basınç artırılmalıdır.

Hava tam çıkmadan basınç uygulanmaya başlanırsa, yer yer kalacak hava paketlerinde sıcaklık istenilen düzeye çıkamaz. Otoklavın aşırı doldurulması, tüplerin cam beher içinde otoklava konulması, vida kapaklı şişelerin ağzının sıkılarak ve tüp ile erlenlerin pamuk ya da tıkaçlarının sıkı olarak otoklava yerleştirilmesi, hava paketlerine neden olur ve sterilizasyon sağlanamaz.

Koliform grup bakteri analizinde kullanılan besiyerlerindeki standart boy Durham tüplerinde, otoklav sonrası hava kalması bir anlamda sterilizasyon yetersizliğinin göstergesidir. Standart bir sterilizasyonda Durham tüplerindeki hava kendiliğinden çıkar. Bu durum, büyük çoğunlukla tüplerin beher ya da benzeri kaplar içinde otoklavlanması sonucunda görülür.

Vida kapaklı şişeler aynı nedenle gevşek olarak kapatılıp otoklavlanır ve işlem sonunda otoklav açıldığında kapaklar sıkılır. Eğer besiyeri çok sıcak iken kapaklar sıkılırsa vakum oluşur ve şişe açılırken dışarıdan hava emmeye bağlı olarak kontaminasyon oluşabilir. Bu nedenle vidalı kapaklar, besiyerinin sıcaklığı yaklaşık 50 °C'a soğuduğu zaman sıkıştırılır.

Otoklavlama sırasında basınç artırılmaya başlanıncaya kadar, buharlaşmaya bağlı olarak besiyerinde hacim azalması olur. Otoklav cinsi, uygulanan işlem gibi nedenlere bağlı olarak hacim azalması %5'ten fazla ise, kaybolan hacim kadar steril saf su eklenir. Seyreltme çözeltilerinde tolerans %2 hacim azalmasıdır.

Tüm bu bilgiler çerçevesinde otoklavda sterilizasyon için dikkat edilmesi gereken noktalar aşağıda özetlenmiştir:

-Otoklav etkinliği kontrol edilmelidir. 04.07. Bölümde bu konuda bilgi vardır.

-Farklı hacimler beraberce otoklavlanmamalıdır. Otoklavda 10 mL hacimde sıvı besiyeri ile kalın et duvarlı bir kaptaki 1 litre hacimde agarlı besiyerinin beraberce sterilize edileceği ortalama bir ısı işlem uygulama süresi aramak tümüyle yanlış olacaktır. Bununla birlikte, günlük uygulamada farklı hacim ve bileşenlerdeki besiyerlerini ayrı ayrı otoklavlamak her zaman mümkün olmayabilir. Agarlı besiyerlerinin eritmek için önceden ısıtılmış olması, toplam ısı girişi çerçevesinde değerlendirilerek, bunların sıvı besiyerlerinde olan normlarda sterilize edilmesine olanak tanır. Ancak agarlı besiyerleri, olması gerekenden daha kısa süre ile (örneğin 20 dakika yerine 15 dakika) otoklavlanıyorsa, şahit olarak bu besiyerinden dökülmüş birkaç Petri kutusunun da inkübatöre konulması gerekir.

-Otoklavlama süresi besiyerinin hacmi, kullanılan cam kapların et kalınlığı, besiyerinin agarlı olup olmamasına göre belirlenmelidir.

-Besiyeri hazırlandıktan sonra ivedilikle sterilize edilmelidir. Dehidre besiyeri ve/veya besiyeri bileşenleri ile cam kaplar, su, tartım ekipmanı vb. materyalde mikroorganizma bulunması doğaldır. Bunlar hazırlanmış besiyerinde hızla gelişerek, besiyerinde başta pH değişmesi olmak üzere bir seri olumsuzluklar meydana getirir. Buna bağlı olarak hazırlanmış besiyerleri en geç 1 saat içinde sterilize edilmelidir. İçinde pepton olan Maximum Recovery Diluent, %0,1 pepton çözeltisi gibi seyreltme çözeltileri de besiyeri gibi düşünülmelidir. %0,85 NaCl bileşimindeki serum fizyolojik ise, hazırlandığı gün içinde sterilize edilmelidir.

-Tüm besiyerleri ısıya duyarlı olan pepton ya da ekstraktları içerir. Bu nedenle aşırı ısı girişinden kaçınılmalıdır. Pepton ve şekerleri içeren besiyeri aşırı ısı işlem görürse, Maillard reaksiyonu (karamelleşme) oluşur. Bu şekilde kararmış besiyerleri, yanlış hazırlandığı gerekçesi ile analizlerde kullanılmaz.

-Agar içeren besiyerleri ısıtılmadan önce birkaç dakika kendi halinde bırakılarak tam ıslanması sağlanmalıdır.

-Her sterilizasyon için tarih, başlama sıcaklığı, sterilizasyon sıcaklığına ulaşma ve bu sıcaklıkta tutulma süresini gösteren kayıtlar tutulmalıdır.

-Kullanılacak besiyerleri ile önceden kullanılmış ve yıkama öncesi sterilize edilecek besiyerleri aynı anda otoklavlanmamalıdır.

Bazı besiyerleri, otoklavda 121 °C'da 15 dakikadan daha düşük sıcaklık ve/veya sürelerde tutularak sterilize edilir. Enterobacter Enrichment Broth ve Litmus Milk (121 °C'da 5 dakika) sterilize edilir. MRS Agar ve MRS Broth daha farklı bir örnek olup, *Bifidobacter* spp.

analizinde kullanılacak ise 118 °C'da 15 dakika, diğer laktik asit bakterileri için kullanılacak ise 121 °C'da 15 dakika olarak sterilize edilmesi önerilir.

Tüm besiyerlerinin üretici firma tarafından gösterilen şekilde otoklavlanması gerekir. Aynı besiyerine ait farklı marka ürünlerde de farklı sterilizasyon normları verilebilir.

04.02.02. Kaynatarak–Isıtarak Sterilizasyon

Bazı besiyerleri otoklavda sterilize edilmez. Örneğin VRB Agar besiyeri sadece kaynar su banyosunda 30 dakika tutulur. Burada, kaynar su banyosuna konulan VRB Agar besiyeri sıcaklığının kaynar su banyosunda 30 dakika tutulması kastedilmektedir. Bu süre, besiyeri merkez sıcaklığının 95–98 °C'a çıkması ve bu sıcaklıkta birkaç dakika kalması için yeterlidir.

Kaynatılarak hazırlanması gereken besiyerleri ideal olarak 100 °C'a ayarlanmış otoklavda tutularak sterilize edilir. Bazı elektronik modellerde olduğu gibi otoklav sıcaklığı 100 °C'a ayarlanamıyorsa, bu amaçla kullanılmaz.

Mikrodalga fırın varsa, kaynatmak amacı ile kullanılabilir. Bu işlemde besiyerinin taşması önlenmeli, fırın ara sıra çalıştırılarak sıcaklık hep kaynama sıcaklığına yakın tutulmalıdır. VRB Agar için kaynama sıcaklığına çok yakın sıcaklıkta birkaç dakika tutmak sterilizasyon için yeterlidir. Aşırı ısıtmanın VRB Agar gibi kaynatılarak sterilize edilen besiyeri performansını olumsuz yönde etkileyeceği de gözde uzak tutulmamalıdır.

Rambach Agar gibi bazı besiyerlerinin sterilizasyonunda sadece agarın eriyeceği kadar ısı işlem uygulanır. Bu amaçla kaynar su banyosunda tutulan ya da mikrodalga fırında ısıtılan besiyeri ara sıra karıştırılarak, agarın tam olarak eriyip erimediği kontrol edilir. Agarın eridiğinin kontrolü ise yavaşça çalkalanan erlenin çeperlerinde erimemiş partikül kalıp kalmadığının gözlenmesi ile yapılır.

Selenite Cystine Broth gibi bazı besiyerleri ise 60 °C'da tutularak sterilize edilir. Bu amaçla sıcak su banyosu kullanılır ve erlen içinde de termometre bulunmalıdır. Sıcaklık istenilen değere ulaştığında birkaç dakika tutulur. Isıl işleme son derece duyarlı bu tip sıvı besiyerlerinin filtrasyon ile sterilize edilmesi önerilir.

Kaynatılarak ya da ısıtılarak sterilize edilen besiyerlerinde kullanılan pamukların arasına küçük sineklerin saklanabildiği, bunların kaynatma sürecinde canlılıklarını koruyabildiği ve sonra besiyerine düşerek kontaminasyona neden olabildiği görülmüştür. Laboratuvarda bulunan pamukların belirli sürelerde etüvde ya da otoklavda sterilize edilmesi bu sorunu ortadan kaldırır.

04.02.03. Tindelizasyon

Otoklav arızalı ya da doğru çalıştığından endişe ediliyor ise Tindelizasyon uygulanabilir. Bu amaçla besiyeri ya da çözelti kaynar su banyosunda 80 °C'da 1 dakika tutulup oda sıcaklığında 1 saat beklenir. Sonra kaynar su banyosunda kaynama sıcaklığında (95–98 °C) 30 dakika tutulur ve hızla soğutulup oda sıcaklığında 8 saat bırakılır. Bu işlem 2 kez daha (toplam 3 kez) uygulanır. Tindelizasyon işleminde 80 °C'da 1 dakikalık ısıtma ve hızla soğutma uygulaması sporların germinasyonu (vejetatif hale geçmesi) için gereklidir. 80 °C kritiktir ve bu amaçla mikrodalga fırın kullanılmaz.

Besiyeri ya da çözeltinin 30 dakika kaynatılması ile bakterilerin spor formu dışındaki tüm mikroorganizmalar öldürülür. Bekleme süreleri ve termal şok ile bakteri sporlarının vejetatif hale geçer. Ardından tekrar kaynatma ile bunlar da öldürülür. Son bekleme ve kaynatma, sterilizasyon güvenliği için uygulanır.

04.03. Kuru Sıcak Uygulaması

Besiyerleri ve çözeltiler gibi sıvıların kuru sıcakta sterilize edilmesi söz konusu değildir. Kuru sıcak uygulamasında etüvde sadece Petri kutuları, pipetler vb. gibi cam malzeme sterilize edilir. Sürtme (swab) örneği almak amacıyla ucuna pamuk sarılmış tahta ya da tel materyal ve homojenizasyon amaçlı kum da etüvde kuru sıcaklık uygulaması ile sterilize edilir.

Etüvde uygulanacak ısı işlem normu farklı kaynaklarda farklı şekilde verilmektedir. Bu kitapta benimsenen norm, FDA tarafından bildirilen şekli ile 170 °C'da 2 saattir.

Her sterilizasyon için tarih, başlama sıcaklığı, sterilizasyon sıcaklığına ulaşma süresi ve bu sterilizasyon süresinin uzunluğunu gösteren kayıtlar tutulmalıdır.

04.04. Membran Filtrasyon

Sadece bazı vitaminler, aminoasitler, şekerler gibi ısı işlem ile sterilize edilemeyen besiyeri bileşenleri, ayrıca buharları otoklava zarar vereceği gerekçesi ile asitler de membran filtrasyon ile sterilize edilir.

Rehidre (sulandırılmış) besiyerlerinin membran filtrasyon ile sterilize edilmesi alışılmış bir yöntem değildir. Sadece uzun süre depolanacak Selenite Cystine Broth besiyerinin membran filtre ile sterilize edilmesi gibi ender koşullarda membran filtre önerilir.

Besiyeri ve çözeltilerin sterilizasyonunda genellikle 0,45 ya da daha kesin sterilizasyon sağlamak üzere 0,20 µm por çaplı membran filtreler kullanılır. Yaygın olarak kullanılan filtreler tek kullanımlık (disposal) olup, steril bir şırınga ucuna vidalanır. Sterilize edilecek sıvı şırıngaya çekilir, filtre şırıngaya vidalanır ve bu şekilde sterilize edilmiş sıvı steril bir kaba aktarılır.

Filtre ile sterilizasyonda dikkat edilmesi gereken hususlar aşağıda özetlenmiştir:

-Filtre edilecek çözeltinin tam çözülmüş olması gerekir.

-Filtre edilmiş çözelti (filtrat) mutlaka steril bir kaba aktarılmalıdır.

-Filtrede sadece standart boydaki mikroorganizmalar tutulur, ancak virüs ve çok küçük boylu bazı mikroorganizmalar filtre altına geçer. Buna göre, membran filtrasyon uygulamasının mutlak bir sterilizasyon olmadığı göz önünden uzak tutulmamalıdır.

04.05. Kimyasal Madde ile Sterilizasyon

Kimyasal maddelerin mikroorganizmalar üzerine farklı etkileri vardır. Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında en yoğun kullanılan dezenfektan, alkoldür. Aksine bir belirtme olmadığı zaman, alkol denildiğinde "etil alkol" anlaşılır. Gerek yayma ekimde kullanılan Drigalski

spatüllerinin, gerek ambalajın gerekse çalışma tezgahlarının dezenfeksiyonunda yaygın olarak alkol kullanılır.

Genel olarak kimyasal maddelerin konsantrasyonu arttıkça dezenfeksiyon etkileri de artar. Ancak, bir istisna olarak alkolün en etkili olduğu konsantrasyon %76 (v/v)'dir. Buna göre %76'lık alkol, saf alkolden daha fazla etkilidir. %76 (v/v) alkol hazırlanması için basit olarak saf (%96–99) alkolden 4 hacim alınıp, üzerine 1 hacim saf su ilave edilir (bakınız; 03.08. Bölüm).

Alkol ile sterilizasyonda aşağıdakilere dikkat edilmelidir.

-Alkol ile temas süresi en az 2 dakika olmalıdır. Yoğun olarak çalışılan denemelerde yeteri kadar cam Drigalski spatülü bulundurulmalıdır. Sporlu bakteriler alkol ile dezenfeksiyona daha dirençlidir ve standart toplam bakteri sayımları sırasında, olduğundan daha fazla sayım sonucuna neden olabilirler.

-Alkolün etkinliği her çalışma periyodunda kontrol edilmelidir. Bu amaçla ekim işlemi bittikten sonra kullanılmış alkolden bir Plate Count Agar besiyerine 0,1 mL aktarılıp, standart şekilde yayma yapılır ve Petri kutusu 28 °C'da 48 saat inkübe edilir. İnkübasyondan sonra bu Petri kutusunda hiçbir mikroorganizma gelişmesi görülmemelidir.

-Alkol açıkta bırakılırsa suya göre daha fazla buharlaşır, konsantrasyonu düşer ve etkisi azalır. Bu nedenle işi biten alkol ağzı sıkıca kapanan bir kapta korunmalıdır.

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında içinde patojen olan bir kabın düşüp kırılması gibi karantina uygulanması durumunda, alkol yeterli olmaz. Buna bağlı olarak, laboratuvarında gerek bu tip kazalara karşı gerek işe başlamadan ve gerek iş bitiminde çalışma masaları ile ellerin dezenfeksiyonunda kullanılmak üzere ticari olarak hazırlanmış dezenfektanlar bulundurulmalıdır.

Bazı hallerde pipet ya da pipet ucu gibi kullanılmış malzemenin doğrudan dezenfektan içeren bir sıvıya bırakılması gerekir. Bu gibi uygulamalarda kullanılacak dezenfektan konsantrasyonu ve uygulama süresi, üretici firma talimatına göre yapılmalıdır. Bu şekilde dezenfekte edilecek materyalin tümüyle ıslanması, kap içinde hava kabarcıkları kalmaması sağlanmalıdır.

Mikroorganizma kültürlerinin yıkama öncesi sterilizasyonu çoğunlukla otoklavda yapılmakla birlikte, bazen kimyasal dezenfeksiyon uygulanır. Standart boyda Petri kutusundaki kültür için en az 10–15 mL dezenfektan gece boyunca uygulanmalıdır. İndol testinden sonra tüplerin kendi halinde bir gece bırakılması ile Kovacs' ayırıcındaki kimyasallar yeterli dezenfeksiyon sağlar.

Dezenfektanların çoğunun toksik etkisi olduğu unutulmamalıdır. Dezenfektan uygulamasından sonra malzeme iyice çalkalanmalı, sonra yıkanmalıdır. Ellerin dezenfeksiyonu için kullanılan bazı dezenfektanlarda uygulamadan sonra ellerin çalkalanmaması gerekir.

04.06. Işınlama ile Sterilizasyon

Işınlama uygulaması, iyonlaştırıcı radyasyon ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyon olarak iki ana gruba ayrılır. İyonlaştırıcı radyasyonun yaydığı enerji 30–34 eV'dan daha yüksektir; X ve

gama ışınları bu grupta yer alır. İyonlaştırıcı olmayan radyasyon ise bu değerden daha düşük enerji yayar; UV ışını bu grupta yer alır.

Dalga boyu 10 nm'den ($100 \text{ \AA}$) daha kısa olan X ışınları ve dalga boyu 0,1 nm'den daha kısa olan gama ışınlarının penetrasyon yeteneği vardır ve buna bağlı olarak ambalajlanmış materyalin sterilizasyonunda kullanılır. Penetrasyon yeteneğinde olmayan UV ışınlarının dalga boyu çok daha yüksektir. Endüstriyel uygulamalarda Co^{60} ve Cs^{137} kaynağından elde edilen gama ışınları ile X ışınları kullanılır.

UV ışınının kısıtlı bir endüstriyel kullanımı vardır. Ancak, UV ışınlarının basit olarak sağlanan lambalardan elde edilmesi ve kullanım kolaylığı nedeni hava, su, düzgün yüzeyler gibi örneklerde mikroorganizma yükünün indirilmesi için yaygın kullanım alanı vardır.

UV spektrumunda farklı dalga boylarında UV ışınları vardır. MUG reaksiyonunun belirlenmesinde 366 nm uzun dalga boylu UV ışını kullanılırken, 210–300 nm dalga boyundaki ışınlar yüksek absorpsiyonlarına bağlı olarak kuvvetli öldürücü etki yapar. UV spektrumu içinde mikroorganizmalar üzerine en fazla etkili olanı 253,7 nm dalga boyundaki ışındır.

Basit fizik yasaları uyarınca UV ışının etkisi aydınlatma gibidir. UV ışının etkisi; kullanılan lambanın gücü ile doğru, lambda ile sterilize edilecek materyal arasındaki uzaklığın karesi ile ters orantılıdır.

Buna göre; tavana asılmış bir UV lambası kullanıldığında, tavana yakın olan yerlerdeki mikroorganizmalar, tabana yakın olanlardan daha fazla etkilenir.

UV lambaları, mikrobiyoloji laboratuvarlarında havanın ve çalışma tezgahlarının sterilizasyonu için kullanılır. Pratik uygulamada UV lambaları gece boyunca açık bırakılır. Bu ışına uzun süre ve yakından bakılması halinde gözde önemli hasarlar meydana gelebilir. Bu nedenle UV lamba düğmesinin laboratuvar kapısının dışında olması önerilir. Kapalı bir kabin içine yerleştirilmiş UV lambaları etrafından hava geçirilerek, bunlar çalışma süresi içinde de kullanılabilir.

UV lambalarının kullanımında belirli bir "lambda ömrü" olduğu dikkate alınmalıdır. Bu süre sonunda da, lambadan aynı açık mavi ışık görülür, ancak bunun içinde etkili dalga boyunda UV ışını kalmamıştır. UV lamba kullanılacak ise satıcı firmadan standart kullanım ömrü öğrenilmelidir. Farklı markalarda farklı kullanım ömrü olabilir. Kullanım ömrü genel olarak 9.000 saattir.

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı açısından X ve gama ışınlamasının pratik uygulaması yoktur. Sadece ışınlanmış Tryptic Soy Broth ve ReadyCult gibi uygulamalar için kullanılmaktadır.

04.07. Sterilizasyon Kontrolü

Sterilizasyon işleminin etkinliği, kimyasal ya da biyolojik indikatörler ile kontrol edilir. Kimyasal indikatörlerin en yaygın kullanılabilecekleri otoklav şeritleridir. Otoklava konulan malzemeye bu şeritlerden yapıştırılır. Standart otoklavlama süresinde ($121 \text{ }^\circ\text{C}$; 15 dakika) şerit renk değiştirir. Aynı uygulama kuru hava sterilizasyonu için de yapılmaktadır. Kuru hava ve otoklav sterilizasyonu için farklı şeritler kullanılır.

Otoklavda sterilizasyon kontrolü için biyolojik sterilizasyon indikatörü (Sterikon) kullanılması da önerilir. Bu kullanım pek çok uluslararası standartta, örneğin FDA Form 2400 (3/01)'de yer almaktadır. Bu amaçla en yaygın kullanılan bakteri *Geobacillus stearothermophilus* (Syn. *Bacillus stearothermophilus*) sporlarıdır. Bu sporlar, içinde 2 mL Nutrient Broth ve bir pH indikatörü olan ampul içinde yaklaşık 10^7 sayıda bulunur. Sporların 121 °C'daki D değeri 2 dakikadır. Buna göre 121 °C'da 15 dakikalık ısı işlemde tümüyle ölürler.

Standart bir otoklavlama işleminde 250 litre hacme kadar olan otoklavlar için 2 ampul, daha büyük olanlar için 6 ampul farklı yerlere yerleştirilir. Otoklavlama sonunda ampuller otoklavlanmamış olan şahit 1 ampul ile birlikte 60 °C'da 48 saat inkübe edilir. Otoklav doğru çalışıyorsa (121 °C'a erişip, bu sıcaklıkta 15 dakika kalıyorsa), ampul içindeki tüm sporlar ölmüş olacağı için inkübasyon sonunda ampullerde bir değişiklik olmaz ve menekşe renk korunur. Aksi halde ampulde sterilizasyon yetersizliği nedeni ile tek bakteri sporu bile canlı kalırsa, bu spor önce germine olur, sonra hızla çoğalır ve pH indikatörü aracılığı ile ampul rengi sarıya döner. Bu biyolojik indikatör hakkında 40.08. Bölümde ayrıntılı bilgi vardır. Bu tip indikatörlerin kullanılamaması halinde, alışlagelmiş bir sterilizasyon kontrol yöntemi "şahit besiyeri" kullanmaktır. İnoküle edilmemiş bir besiyerinin inoküle edilmişler ile birlikte inkübe edilmesi, sterilizasyonun ne denli sağlandığını gösterebilir. Bu konuda yapılabilecek büyük bir hata, agarlı besiyeri olan Petri kutularının tümünün 48 saat inkübatörde bırakılarak sterilite testi yapılmasıdır. Böyle bir uygulamada steril olduğuna karar verilen besiyerlerinde gereğinden fazla kuruma olacak ve ekim sonrası istenilen performans alınamayacaktır.

Kuru sıcak uygulamasında sterilizasyon etkinliği, *Bacillus atrophaeus* (Syn. *Bacillus subtilis* var. *niger*) ile kontrol edilir. Standart kuru hava sterilizasyonu sırasında etüvde farklı yerlere konulacak Petri kutuları içine 10^6 düzeyinde spor emdirilmiş olan şeritler yerleştirilir. İşlem bitince bu şeritler Tryptic Soy Broth besiyeri içine atılıp, 28–30 °C'da 48 saate kadar inkübe edilir.

Sterilizasyon yeterli bir şekilde yapıldı ise besiyerinde bir gelişme olmaz. Aksi halde besiyeri renginde bir bulanıklık ile sporların öldürülmesinin yetersiz kalmış olduğu anlaşılır.

Membran filtrasyon ile yapılan sterilizasyonun kontrolü için, 10^7 *Pseudomonas diminuta* içeren 100 mL seyreltme çözeltilisi filtre edilir ve 10 mL filtrat, 10 mL çift kuvvetli Tryptic Soy Broth'a ilave edilerek, 28–30 °C'da 48 saat inkübe edilir. Bu süre sonunda besiyerinde gelişme (bulanıklık) görülmemelidir.

04.08. Sterilize Edilmeyen Çözeltiler

Besiyerlerinin bileşimine giren antibiyotikler gibi bazı katkıların sterilizasyonuna gerek yoktur. İlgili talimatlarda yazıldığı şekilde üzerlerine sadece steril su (ya da steril su + alkol) ilave edilir. Çözelti halinde ise doğrudan kullanılır.

Yumurta sarısı ile yumurta sarısı tellurit emülsiyonu gibi bazı katkıları üretici firma tarafından önceden sterilize edildikleri için, ayrı bir sterilizasyon işlemine gerek yoktur. Bununla birlikte, çoğu üretici firma tarafından yumurta ve ürünlerinin sterilizasyon kontrolü yapılması önerilir.

Yumurta sarısı emülsiyonunun laboratuvarında hazırlanması gerekli ise, %76 (v/v) etil alkol çözeltisinde en az 5 dakika tutulur. Sonra sarısı ve beyazı ayrılıp, sarısı steril bir kaba alınır. Bu amaçla dış kabuğu kirli olan ya da kirli olduğundan endişe edilen yumurtalar kesinlikle kullanılmamalı, asla kirli kabuğun fırçalanarak temizlenmesi yoluna gidilmemelidir.

Başta Kanlı Agar olmak üzere çeşitli besiyerlerinin bileşimine katılan kanın "steril olduğu" kabul edilir. Bunun için sağlıklı bir hayvandan aseptik koşullara uyarak kan alınmalıdır. Kanlı agar tercihen dış laboratuvarından sağlanmalıdır (bakınız; 10. ve 40.06. Bölüm).

04.09. D ve Z Değerleri

Öldürücü düzeyde herhangi bir işlemin (ısıl işlem, kimyasal madde uygulaması, ışınlama) canlılar üzerindeki etkisi, zamana bağlı bir fonksiyon olarak verilir. Tam olarak tanımlanmış bir uygulamada, belirli bir canlı türü için sayının %90'ının (1 log birimi) azalması için gereken süre D değeri (desimal indirgeme süresi) olarak tanımlanır ve dakika ile ifade edilir. D değeri, öldürücü bir işlemin etki süresi ile ilgilidir ve bu nedenle sadece fiziksel bir ayırma işlemi olan membran filtrasyon için söz konusu değildir.

Buna göre;

-Uygulamanın yapıldığı ortam tam olarak tanımlanmalıdır (yağsız içme sütü, yarım yağlı dana kıyması vb.).

-Hedef mikroorganizma tür hatta serotip düzeyinde tanımlanmalıdır (*Bacillus cereus* sporu, *E. coli* O157:H7 serotipi vb.).

-Uygulanan işlem tam olarak tanımlanmalıdır (108 °C'da buharlı sterilizasyon, ışınlama, %73 alkol vb.).

Geobacillus stearothermophilus sporlarının Nutrient Broth ortamında 121 °C'daki D değerinin 2 dakika olması, her 2 dakika sonra spor sayısında 10 misli (1 log birimi) azalma olacağını (sporların %90'ının ölüp, %10'unun canlı kalacağını) ifade eder. Bir diğer deyiş ile, 121 °C'da başlangıçta (0 anı) 10^7 olan spor sayısı, 2 dakika sonra 10^6 , 4 dakika sonra 10^5 , 14. dakika sonra $10^0=1$ bakteriye düşecek ve 1 dakika sonra bu bakteri de öleceği için Sterikon sterilize edilmiş olacaktır.

Aynı mikroorganizma, aynı öldürücü işlem olsa bile ortamdaki pH, şeker konsantrasyonu gibi faktörler D değeri üzerine önemli etki yapar. pH ne kadar düşük ise ısıl işlemin etkisi o denli artar. Ancak, yüksek şeker konsantrasyonu bazen mikroorganizma üzerinde koruyucu etki oluşturur. Bu nedenle D değeri ifade edilirken, ortam belirgin bir şekilde tanımlanmalıdır.

Isıl işlemde D değeri, uygulanan sıcaklık ile birlikte verilir. $D_{109}= 0,3$ dakika; 109 °C'da her 0,3 dakikada (18 saniyede) canlılıkta 1 log azalma olacağını gösterir.

Endüstriyel ışınlamada D değeri kavramı biraz farklıdır. Isıl işlemde farklı sıcaklıklar, kimyasal uygulamada farklı konsantrasyonlar uygulanmakla beraber, ışınlamada konsantrasyon farkı yoktur. Işın kaynağının belirli bir gücü vardır. Bu güç ilave üniteler ile artırılabilir öldürücü etki canlıların absorbe ettiği enerji ile ilişkilidir. Işın kaynağının Co^{60} ya da Cs^{137} olması da önemli değildir. *E. coli* için gama ışınlamada yağsız kıyma için $D_{10}= 0,30$ kGy ifadesi, gücü ne olursa olsun bir ışın kaynağından elde edilen gama ışınlarının her 0,30 kGy uygulanması halinde canlılıkta 1 log azalma olacağını gösterir. Bazı ışın kaynakları, bu

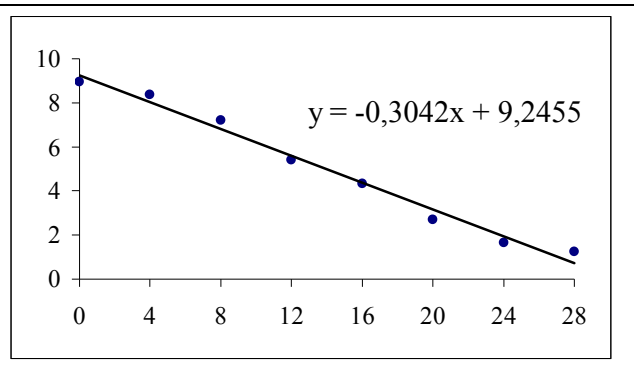
dozu 30 dakikada, bazısı 5 dakikada verebilirse de, bu önemli değildir ve D değeri yaklaşımı ile uyumsuz olmaz. Önemli olan, kaç kGy ışın verildiğidir.

Isıl işlemde "D" altında genel olarak uygulanan sıcaklık derecesi verilirken, ışınlamada genel olarak "D altı 10" yazılır. Bunun nedeni, ışınlama ile ısıl işlem arasında yukarıda açıklanan farklılıktır ve logaritmik bir işlem olduğunu belirtmek üzere D_{10} olarak belirtilir. Isıl işlemde de D_{10} belirtmelerine rastlanır. Bu belirtme, $\log_{10}$ ifadesi gibidir. Bununla beraber, bazı kaynaklarda ısıl işlem ve kimyasal madde uygulaması için de D_{10} şeklinde belirtmeler vardır. Aşağıda D değeri hesaplaması için bir örnek verilmiştir.

Çizelge 05. D Değeri

Süre	log kob/mL
0	8,963
4	8,380
8	7,204
12	5,410
16	4,342
20	2,690
24	1,653
28	1,255

Şekil 07. D Değeri grafiği



Elde edilen verilerin bilgisayar ortamında MS Excel ya da benzeri bir program kullanılarak grafiği çizilir. Eğim çizgisinin formülünü bu program verir. Bu örnekte $Y = -0,3042X - 9,2455$ olarak elde edilen denklemde, Y için ardışık 2 sayı (örneğin, 5 ve 6) verilerek bunlara karşı gelen X değerleri hesaplanır. Fark, D değeridir. Yine bu örnekte $Y = 5$ için $X = 13,97$ ve $Y = 6$ için $X = 10,63$ olarak bulunur ve bu 2 X değeri farkı olan 3,34 dakika= 200 saniye, D değeri olarak hesaplanır.

Genel bir yaklaşım ile, öldürücü etkiye sahip uygulamalarda konsantrasyon arttıkça öldürücü etki de artar (alkol bu genellemenin dışındadır). Buna göre 96 °C'da yapılan uygulamada $D_{96} = 3$ dakika olarak bulunuyorsa, aynı koşullarda ve aynı mikroorganizma için sıcaklık artırıldığında daha kısa ve tersine olarak sıcaklık azaltıldığında daha uzun süreli D değerleri elde edileceği açıktır. Benzer şekilde, bir kimyasalın %1 derişimde D değeri 4 dakika ise, %2 derişimde daha kısa ve %0,2 derişimde daha uzun D değerleri elde edilecektir.

Z değeri, genellikle ısıl işlem için kullanılan bir kavramdır ve °C olarak ifade edilir. D değerinde 1 log birimi değişiklik için gereken sıcaklık değişimi olarak tanımlanır. Örneğin, $D_{96} = 3$ dakika ise D değerinde 1 log birimi değişiklik, yani D değerinin 0,3 dakika olması için sıcaklığın ne olması gerektiğidir. Buradaki örnekte $Z = 6,7$ °C olarak bulunursa sıcaklık $96 + 6,7 = 102,7$ °C ısıl işlemde D değeri 0,3 dakika ve tersine olarak $96 - 6,7 = 89,3$ °C'da D değeri 30 dakika olacaktır.

D ve Z değerleri laboratuvarından çok endüstriyel uygulamalar için geçerlidir. Bu kitapta kısaca yer almasının nedeni, bu kitabın işletmede çalışan teknik elemanlara da yararlı olması dileğidir.